

DISS ETH NO. 26319

The multifaceted roles of Nrf2 in immunity, wound healing, and epidermal barrier function

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SUKALP MUZUMDAR

Master of Science (M.Sc. ETH), ETH Zürich
Zürich, Switzerland

born on October 7th, 1990
citizen of India

on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner
PD Dr. Matthias Schäfer, co-examiner
Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner
Prof. Dr. Mitchell Levesque, co-examiner

2019

Summary

Best-known for its role in the cellular oxidative stress response, the Nrf2 transcription factor is now known to be implicated in a wide variety of biological processes. In order to probe the intricacies of the functions of this transcription factor, our research group generated mice expressing a constitutively active Nrf2 (caNrf2) mutant in keratinocytes. The resulting activation of Nrf2 in keratinocytes led to an enhanced protection from UV irradiation, however when the expression level of the transgene was increased, it resulted in hyperkeratosis and epidermal hyperplasia, combined with a chronic, cutaneous inflammation. While the hyperkeratosis was mediated at least in part by the caNrf2-mediated upregulation of the protease inhibitor Slpi, which inhibits proteases critical for *stratum corneum* desquamation, the epidermal hyperplasia (eventually resulting in acanthosis) observed was found to be a secondary effect of Nrf2-mediated upregulation of the barrier component protein Sprr2d. The strongly increased Sprr2d levels in the epidermis of transgenic mice led to a breakdown of the epithelial permeability barrier, and subsequently to a cutaneous inflammatory infiltrate and the release of keratinocyte mitogens.

In this doctoral thesis, I started out by further investigating the link between the observed barrier dysfunction, immune cell infiltration, and keratinocyte hyperproliferation in Nrf2-overexpressing mice. Following up on data obtained in earlier microarray analysis, we were able to demonstrate that Nrf2 activation initiates an interleukin (Il)-36 γ -driven autocrine and paracrine signaling cascade, culminating in the proliferation of keratinocytes via cell-autonomous Il-36 γ signaling, combined with Il-36 γ -mediated secretion of keratinocyte mitogens by fibroblasts.

As the epithelium of cutaneous wounds is subject to high levels of oxidative stress due to the infiltration of immune cells, as a part of this thesis I also investigated the role played by Nrf2 activation in the context of acute wound healing. We discovered that Nrf2-overexpressing mice closed full-thickness excisional wounds faster than control mice. Surprisingly, this accelerated wound closure was caused by an expansion of pilosebaceous stem cells in caNrf2 transgenic mice, which made a larger pool of cells available to migrate into and close wounds. This expansion was effected at least in part through the Nrf2-mediated upregulation of the epidermal growth factor receptor (EGF) ligand epigen, and consequent activation of EGF receptor signaling. These results establish Nrf2 activation as a potential novel strategy to promote wound healing.

Netherton syndrome is a rare, autosomal recessive genetic disorder caused by loss-of-function mutations in the gene *SPINK5* encoding the protease inhibitor LEKTI. Inactivation of *SPINK5* leads to a dysregulation of the protease-protease inhibitor balance crucial for epidermal homeostasis and maintenance of the epidermal permeability barrier. As Nrf2 has been implicated as a key regulator of epidermal barrier function, we also investigated the effect of Nrf2 activation in a murine model of Netherton syndrome (Spink5ko mice). We found that genetic activation of Nrf2 in Spink5ko mice led to a significant amelioration of their phenotype, including a significant improvement of the inside-out and

outside-in epidermal barrier, and a reduction in the expression of pro-inflammatory molecules. These results suggest activation of Nrf2 is a promising avenue for the treatment of patients with Netherton syndrome.

Thus, in the scope of this thesis several novel roles of Nrf2 in the context of the cutaneous immune system, wound healing and epidermal barrier dysfunction were uncovered, which have the potential to be exploited for developing novel treatment modalities.

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist neben seiner bekannten Rolle bei der Erhaltung der zellulären Redox-Homöostase auch an vielen anderen biologischen Prozessen beteiligt. Zur Funktionsanalyse von Nrf2 in der Haut generierte unsere Arbeitsgruppe transgene Mäuse, die eine konstitutiv aktive (ca) Nrf2 Mutante in Keratinozyten exprimieren. Die resultierende Aktivierung von Nrf2 Zielgenen in diesen Zellen führte zu einem besseren Schutz vor UV-Strahlung. Eine stärkere Expression des Transgens führte jedoch auch zu Hyperkeratose und Akanthose der Epidermis sowie zu einer chronischen Entzündung der Haut. Die Hyperkeratose resultierte zumindest zum Teil von der caNrf2-induzierten verstärkten Expression des Proteinase-Inhibitors Sipi, welcher Proteasen hemmt, die für die Abschuppung der Hornhaut notwendig sind. Die Akanthose ist zumindest zum Teil auf die Nrf2-induzierte Expression von Sprr2d zurückzuführen, welches eine wichtige Komponente der epidermalen Barriere darstellt. Die erhöhte Expression von Sprr2d in der Epidermis der transgenen Mäuse führte zu einem Defekt in der epithelialen Permeabilitätsbarriere. Hierdurch kam es zu einem verstärkten Wasserverlust durch die Haut, was eine Entzündungsreaktion und die Produktion von Wachstumsfaktoren auslöste, welche die Teilung von Keratinozyten stimulieren.

Im Rahmen meiner Dissertationsarbeit führte ich weiterführende Untersuchungen durch, um den Zusammenhang zwischen Barriere-Störung, Immunzell-Infiltration und Keratinozyten-Hyperproliferation in den Nrf2-transgenen Mäusen zu untersuchen. Basierend auf Daten von früher durchgeführten Microarray-Analysen konnten wir zeigen, dass Nrf2 eine Interleukin (IL)-36 γ -induzierte autokrine and parakrine Signalkaskade anschaltet, die zur verstärkten Teilung der Keratinozyten führt. Dies geschieht einerseits durch verstärkte zell-autonome direkte Stimulierung der Zellen durch IL-36 γ , und andererseits durch IL-36 γ vermittelte Sezernierung von Keratinozyten-Wachstumsfaktoren durch Fibroblasten.

Da das regenerierende Epithel von Wunden in der Haut während der Heilungsphase oxidativem Stress ausgesetzt ist, welcher insbesondere durch die Infiltration von Immunzellen ausgelöst wird, untersuchte ich im Rahmen meiner Dissertationsarbeit auch die Effekte einer Nrf2 Aktivierung bei der Wundheilung. Wir fanden heraus, dass caNrf2-exprimierende Mäuse einen beschleunigten Wundschluss aufzeigen. Dieser resultierte überraschenderweise aus einer Expansion der Keratinozyten-Stammzellen in den Haarfollikeln und Talgdrüsen der caNrf2 transgenen Mäuse. Hierdurch wurden grössere Mengen an Keratinozyten am Wundrand gebildet, die verstärkt in die Wunde einwandern und zur Reepithelialisierung beitragen können. Die vermehrte Teilung dieser Keratinozyten-Stammzellen war zumindest teilweise auf die Nrf2-vermittelte Expression von Epigen zurückzuführen. Dieser Wachstumsfaktor aus der Familie der "Epidermal Growth Factors" führte zur Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren auf Keratinozyten und damit zur Zellteilung. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aktivierung von NRF2 eine mögliche neue Strategie für die Verbesserung der Wundheilung darstellen könnte.

Netherton-Syndrom ist eine seltene, autosomal rezessive Erbkrankheit, die auf Mutationen im SPINK5 Gen zurückzuführen ist, welches für den Protease-Inhibitor LEKTI kodiert. Hierdurch kommt es zum Verlust eines funktionsfähigen LEKTI Proteins und damit zur Fehlregulation des Protease-Protease-Inhibitor Verhältnisses, welches für die epidermale Homöostase und die Erhaltung der epidermalen Permeabilitätsbarriere wichtig ist. Da Nrf2 ein Schlüsselregulator der epidermalen Barriere ist, untersuchten wir die Konsequenzen der Nrf2 Aktivierung in einem Mausmodell für Netherton-Syndrom (Spink5 Knockoutmäuse). Interessanterweise führte die genetische Aktivierung von Nrf2 in Spink5ko Knockoutmäusen zu einer deutlichen Linderung des Phänotyps, einschliesslich einer Verbesserung der epidermalen Barriere und einer reduzierten Expression von pro-inflammatorischen Molekülen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von NRF2 möglicherweise für die Behandlung von Patienten mit Netherton-Syndrom eingesetzt werden könnte.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Dissertationsarbeit neue Funktionen von Nrf2 in der Haut aufgedeckt werden, einschliesslich Funktionen im Immunsystem der Haut, bei der Wundheilung und bei der Regulation der epidermalen Barriere. Diese Funktionen bilden möglicherweise die Grundlage für die zukünftige Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von Wundheilungsstörungen und Hauterkrankungen, die durch einen Defekt in der epidermalen Barriere gekennzeichnet sind.